

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Oksüdatiivse stressi detekteerimine fluorestseeruva bioreporteriga bakteris *Escherichia coli*
ampitsilliini juuresolekul**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogias

12 EAP

Johanna Liis Udumets

Juhendajad teadur Marta Putrinš

TARTU 2019

„Oksüdatiivse stressi detekteerimine fluorestseeruva bioreporteriga bakteris *Escherichia coli* ampitsiliini juuresolekul”

Antibiootikumide laialdase kasutuse tõttu on probleemiks antibiootikumidele resistentseid gene kandvad või ekspresseerivad bakterid. Seega tuleks leida uusi antibiootikume või suurendada olemasolevate efektiivsust. Reaktiivsete hapniku liikide suurendamisega või kaitsemehhanismide mõjutamisega võiks saavutada antibiootikumide efektiivsema toime. Bioreportereid on geneetiliselt muundatud mikroobirakud, mis suudavad keskkonnast tuvastada erinevaid ühendeid. Käesolevas bakalaureusetöös konstrueeriti kaks redoks-tundlikku fluorestseeruvat bioreporterit.. Need signaliseerisid suurenenud oksüdatiivse stressi taset antibiootikumide juuresolekul. Antud reportersüsteem töötab, kuid vajab lisakatsetusi.

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; T490 Biotehnoloogia

Märksõnad: antibiootikum, bakter, bioreporter, fluorestseeruvad valgud, oksüdatiivne stress

“Detection of oxidative stress with fluorescent bioreporter in *Escherichia coli* in presence of ampicillin”

Because of the widespread use of antibiotics, there are a problem with bacteria that carry or express antibiotic-resistant genes. It is necessary to find new antibiotics or increase the existing antibiotics effectiveness. Increasing the number of reactive oxygen species or influencing the protection mechanism could lead to more effective antibiotics. Bioreporters are genetically modified microbial cells that can detect different compounds from the environment. In this bachelor thesis, two redox-sensitive fluorescent bioreporters were constructed. They signaled the oxidative stress in the presence of antibiotics. This reporter system works but needs extra testing.

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; T490 biotechnology

Keywords: antibiotic, bacterium, bioreporter, fluorescent protein, oxidative stress

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	6
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Antibiootikumid.....	7
1.1.1. β -laktaamsed antibiootikumid.....	8
1.1.2. Antibiootikumide resistentsus	8
1.2. Oksüdatiivne stress.....	9
1.2.1. Antibiootikumid ja oksüdatiivne stress	10
1.3. Fluorestseeruvad reportervalgud.....	12
1.3.1 Fluorotseeruvad valgud	12
1.3.2. roGFP	13
2. EKSPERIMENTAALOSA	15
2.1. Töö eesmärgid.....	15
2.2. Materjal ja metoodika.....	15
2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja bakterite kasvutingimused.....	15
2.2.2. Kasutatud antibiootikumid	16
2.2.3. Kasutatud praimerid ja plasmiidid.	16
2.2.5 Geeleketroforees.....	18
2.2.6. DNA puhastamine	18
2.2.7. CPEC tingimused	19
2.2.8. Transformeerimine DH5 α rakkudesse	19
2.2.9. Plasmiidse DNA eraldamine	20
2.2.10. DMSO säilituskultuuride tegemine.....	20
2.2.11. Reporterite valideerimine	20
2.3. Tulemused ja arutelu.....	21
2.3.1. Reporterplasmiidide konstrueerimine	21
2.3.2. <i>E.Coli</i> tüves MG1655 rakkude reporterplasmiidide kontrollimine	22
2.3.3. Antibiootikumidega reporterplasmiidide kontrollimine.....	23
TÄNUSÕNAD.....	34
KIRJANDUSE LOETELU.....	35
LISA 1.....	41
LIHTLITSENTS.....	45

KASUTATUD LÜHENDID

Amp- Ampitsiliin

CPEC- tsirkulaarne polümeraas-ekstensioonkloonimine– Circular polymerase extension cloning

DMSO- dimetüülsulfoksiid

DNA- desoksüribonukleinhape

DTT- ditiotreitol

FITC- fluorestseiniisotiotsüanaat

FP- fluorestsentsvalk

Glc- glükoos

LB- Luria-Bertanin sööde

MOPS- 3-[N-morfoliin]propaansulfoonhape, puhver

noFP- tühi plasmiid, mis ei sidalda roheliselt fluorestseeruvat valku

Orp- tiolperoksidaas

PCR- polümeraas ahelreaktsioon

roGFP- redutseerimis ja oksüdatsiooni tundlik roheliselt fluorestseeruv valk

roGFP_Orp1- fluorestseeruv valk, kus on seotud Orp1 ja roGFP

ROS- reaktiivsed hapnikuühendid

TAE- puhverlahus mis sisaldab Tris aluse, äädikhappe ja etüleendiamiintetraäädikhappe segu

SISSEJUHATUS

Antibiootikumid on jaotatud bakterotsiidseteks või bakterostaatilisteks. Samuti on need jaotatud nende toimetehhanismide ja keemiliste omaduste järgi nelja suuremasse rühma. Bakterite rakusena moodustumist inhibeerivad antibiootikumid, valgusünteesi mõjutavad antibiootikumid, bakteriaalset nukleiinhapete sünteesi häirivad antibiootikumid ja folaadi metabolismi võtmeensüümidesse sekkuvad antibiootikumid.

Tänapäeval on antibiootikumide väga laialdase kasutamise tõttu, saanud suureks probleemiks bakterite resistentsus antibiootikumidele. On tekkinud multiresistentsed bakterid, mis suudavad kasvada ja ellu jääda bakterotsiidsete ainete juuresolekul (Hansen *et al.*, 2008). Levinuimad probleeme tekitavad multiresistentsed bakterid on näiteks *Escherchia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* ja *Staphylococcus aureus* (Dahal ja Chaudhary, 2018).

Euroopas on üle 40% bakteritest antibiootikumidele resistentsed. (Roth *et al.*, 2019) See on maailmale suureks väljakutseks, kuna paljud ravimid ei ole enam efektiivsed. Bakteritel aitab karmides tingimustes ellu jääda näiteks välismembraani läbilaskvuse vähendamine. See kaitseb neid nii reaktiivsete hapnikuühendite kui ka antibiootikumide eest. Bakterid võitlevad sageli oksüdatiivse stressiga, mida võib tekitada reaktiivsete hapnikuühendite ületootmine.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse nelja laialdaselt kasutatavat antibiootikumi. Antakse ülevaade bakterite oksüdatiivsest stressist, näidatakse selle seost antibiootikumidega, kirjeldatakse antibiootikumide resistentsuse tekkimist ning sellega kaasnevaid probleeme. Samuti antakse ülevaade fluorestsentsist ning erinevatest fluoretseeruvatest valkudest nagu GFP, roGFP ja roGFP-Orp1. Kuna on olemas vastuolulisi tulemusi bakteritel oksüdatiivse stressi tekkimisel antibiootikumide tõttu, siis praktilises osas eemärgiks on uurida bakterite oksüdatiivse stressi tekkimist erinevatel ampitsiliini konsentratsioonidel. Täpsemalt on eesmärgiks konstrueerida bioreporterid ning mõõta, kas ampitsiliin põhjustab oksüdatiivset stressi.

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Antibiootikumid

Antibiootikumid on lahustuvad ühendid, mis on toodetud bakterite kasvu inhibeeriva organismi poolt. (Gasbarre, Schmitt ja Tomecki, 2012)

Teadmised antibiootikumidest on tegelikult väga algelised. Tuhandetest avastatud looduslikest antibiootikumidest on teada vaid mõndade antibiootikumide mõju. On ebaselge, miks ja kuidas ühed ühendid tungivad hästi bakteri rakudesse ja teised mitte. Antibiootikumide avastamise kuldsel ajastul, 1960. aastatel isoleeriti enamik antibiootikume algselt pinnase aktinomütseetidest ehk kiirikbakteritest (Lewis, 2013)

Antibiootikumid jagunevad bakteriitsidseteks ehk rakusurma põhjustavateks või bakteriostaatilisteks ehk rakkude kasvu või jagunemist pidurdavateks. Immunokompetentses peremeesorganismis võivad mõlemad toimemehhanismid patogeene kõrvaldada. Infektsiooni likvideerimisel on omadustel nagu imendumine, jaotumine kudedes, ravimi metabolism ning eliminatsioon sageli tähtsam roll, kui see kas antibiootikum on bakteriotsiidne või bakteriostaatiline. (Gasbarre, Schmitt ja Tomecki, 2012)

Antibiootikumid jaotatakse nende keemiliste omaduste ja toimemehhanismide järgi nelja suuremasse rühma. **Esiteks** need, mis inhibeerivad bakteriaalsete seinte moodustumist. Näiteks nagu β -laktaamsed antibiootikumid ja vankomütsiinid, mis on laia toimspektriga ja bakteriitsidseid. **Teiseks** rühmaks on need antibiootikumid, mis mõjutavad valgu sünteesi seondudes bakteri 50S või 30S ribosomaalse subühikuga. Selles rühmas võivad olla nii bakteriostaatilised kui ka bakteriitsidseid antibiootikumid. Pöörduva seondumise korral peatub tavaliselt mikroobide kasv, mille tulemuseks on bakteriostaatiline seondumine. Aminoglükosiididega esineb aga pöördumatu bakteriitsidne seondumine. **Kolmandaks** on need antibiootikumid, mis häirivad bakteriaalset nukleiinhapete sünteesi. Näiteks rifampiin inhibeerib RNA polümeraasi ja kinoloonid inhibeerivad bakterite topoisomeraasi. Need ained on tavaliselt bakteriitsidseid. Fluorokinoloonid kuuluvad tänapäeval kasutatavate enim oluliste antibakteriaalsete ainete hulka. Nende ravimite kasutamise peamiseks probleemiks on virulentsemate ja resistentsemate bakteri tüvede tekkimine. Need tekivad kas DNA-d (desoksüribonukleiinhape) siduvate valkude või väljavoolupumba mehhanismi väljatöötamisega. (Ezelarab *et al.*, 2018)

Neljandaks ehk viimaseks antibiootikumide rühmaks on folaadi metabolismi võtmeensüümidesse sekkuvad antibiootikumid. Selleks on näiteks sulfoonamiidid ja trimetoprim. (Gasbarre, Schmitt ja Tomecki, 2012) Trimetoprim on laialdaselt kasutatav antibiootikum, kuid selle efektiivsust piirab sageli vähenenud lahustuvus vees ning toksilisus. Potentsiaalseks lahenduseks oleks trimetoprimi konjugeerimine oligosahhariididega, takistuseks on aga trimetoprimi tundlikkus keemilistele modifikatsioonidele ja oligosahhariidide kiire lagunemine. (Wang *et al.*, 2018) Trimetoprim blokeerib dihidrofolaaadi redutseerumist tetrahidrofolaadiks. Trimetoprimil on inhibeeriv toime enamiku grampositiivsete aeroobsete kokkide suhtes ja mõnede gramnegatiivsete aeroobsete bakterite suhtes. Trimetoprimi omandatud resistentsus tuleneb kromosomaalsetest mutatsioonidest, mille tulemusel hakatakse tootma dihidrofolaaadi reduktaasi ensüümi. See on vähem tundlik trimetoprimi inhibeerimise suhtes. (Gleckman, Blagg ja Joubert, 1981)

1.1.1. β -laktaamsed antibiootikumid

Üks kõige sagedamini kasutatav antibiootikumide rühm on β -laktaamsed antibiootikumid. Aastal 1920 avastati bensüülpenitsiliin, mis pani alguse tuhandetele uutele penitsiliini derivaatidele ja nendega seotud tsefalosporiinide β -laktaamidele, tsefamütsiinidele, monobaktaamidele ja karbapeneemidele. (Bush ja Bradford, 2016) β -laktaamsed antibiootikumid mõjutavad otseselt membraani terviklikkust, inhibeerides rakuseina biosünteesi. (Van Acker ja Coenye, 2017)

β -laktaamsetel antibiootikumidel on neljaosaline laktaam ehk tsükliline amiid. Penitsiliin kuulub β -laktaamsete antibiootikumide rühma, on laialdaselt kasutusel ning väga efektiivne. Seda kasutatakse mitmete nakkushaiguste raviks. (Kadurina, Bocheva ja Tonev, 2003) β -laktamaasi tootmine ehk ensüümi tootmine, mis lagundab β -laktaamseid antibiootikume on laialdaselt levinud antibiootikumide resistentsuse mehhanism. (Zeng ja Lin, 2013)

1.1.2. Antibiootikumide resistentsus

Tänapäeval on võimalik ravida kõikvõimalikke nakkushaigusi tänu varasemalt avastatud antibiootikumidele. See põhjustab aga antibiootikumidele resistentsete bakterite teket. (Lingzhi *et al.*, 2018) Tavaliselt on resistentsus klassikaliste kromosomaalsete mutatsioonide tõttu seotud keskkonnas esinevate teiste bakterite ekstrakromosomaalsete elementidega. Nende hulka kuuluvad erinevad DNA segmendid nagu plasmiidid, transposoonid ja integronid. (Aleksun ja Levy, 2007)

Integron on geneetiline element, mis tagab horisontaalse geeni ülekande nii bakteri populatsioonide ja liikide siseselt kui ka nende vahel. (Domingues, da Silva ja Nielsen, 2012)

Bakterite multiresistentsust soodustavateks teguriteks peetakse aga hoopis bakterite sisemisi mehhanisme nagu väljavoolupumbad, mis eemaldavad mitut liiki antibiootikume. (Alekhun ja Levy, 2007) Multiresistentsed bakterid kasvavad ja ei sure bakteritsiidsete ainete juuresolekul. (Hansen *et al.*, 2008) Pealmiseid probleeme tekitavad multiresistentsed bakterid on näiteks *Escherchia coli*, *Pseudomionas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* ja *Staphylococcus aureus*. (Dahal ja Chaudhary, 2018) Kui multiresistentsed bakterid on tekkinud, hakkavad need levima ülemaailmselt, põhjustades puudusi infektsioonide ravis. (Alekhun ja Levy, 2007)

Maailmale on antimikroobne resistentsus suureks väljakutseks. Paljud tuntud antibiootikumid on nüüdseks mitmete haiguste ravimisel ebaefektiivsed. Viimastel aastatel on suurenenud näiteks ampitsiliini, klooramfenikooli, gentamüsiini ja veel paljude antibiootikumide resistentsus. (Dahal ja Chaudhary, 2018) Keskmine antibiootikumide resistentsus Euroopas ulatub üle 40%. (Roth *et al.*, 2019)

1.2. Oksüdatiivne stress

Oksüdatiivne stress võib tuleneda reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) ülemäärasest tootmisest metaboolsete reaktsioonide abil. Reaktiivsed hapnikuühendid on väga reaktiivsed molekulid nende struktuuris olevate paaritute elektronide tõttu, mis võivad kahjustada rakustruktuure nagu süsivesikud, nukleiinhapped, lipiidid ja valgud ning muuta nende funktsioone. Reaktiivseid hapnikuühendeid toodavad rakus läbiviidavad metaboolsed reaktsioonid ja keskkonna tegurid. (Birben *et al.*, 2012)

ROS-i homeostaasi ainuraksetes ja hulkraksetes ei saa võrrelda, kuna näiteks ei vaja imetajarakud mehhanisme, mis pidevalt reguleeriksid ROS-i konsentratsiooni, vaid reageerivad alles oksüdatiivsele stressile, samal ajal kui ainuraksete organismide jaoks on see mehhanism hädavajalik. (D'Autréaux ja Toledano, 2007) ROS hõlmab keemilisi aineid, mis moodustuvad hapniku mittetäieliku redutseerumise käigus. (Kim *et al.*, 2019) ROS sisaldab vabasid radikaale. (Phaniendra, Jestadi ja Periyasamy, 2015) Tuntud ROS-id on superoksiid anioon (O_2^-), vesinikperoksiid (H_2O_2) ja hüdroksüülradikaal (HO^\cdot). (D'Autréaux ja Toledano, 2007)

Vesinikperoksiid (H_2O_2) on üldlevinud bioloogiline molekul, mille laialdased bioloogilised funktsioonid sõltuvad selle kontsentratsioonist. (Marinho, Cyrne ja Antunes, 2013) H_2O_2 toimib signaalmolekulina oksüdeerides redoksreguleeritud sihtvalkudesse kriitilisi tiolrühmi. (Gutscher *et al.*, 2009)

Aeroobsed bakterid võitlevad pidevalt võimaliku oksüdatiivse stressiga endogeensete ja eksogeensete ROS-ide tõttu. Bakteritel on palju kaitsemehhanisme ja stressivastusi näiteks katalaasid ja peroksidaasid. (van der Heijden, Vogt, *et al.*, 2016) Oksüdatiivne stress tuleneb sellest, et koguneb liialt ROS-e ning rakud ei ole võimelised neid detoksifitseerima. Kuigi ROS-i teke on normaalse hapniku hingamise ja ainevahetuse ajal iseeneslik, suurendavad ROS-i teket membraani kahjustavad ained ja bakteritsiidsete antibiootikumid, mis suurendavad nende antimikroobset bioaktiivsust. (Kim *et al.*, 2019)

1.2.1. Antibiootikumid ja oksüdatiivne stress

Gramnegatiivsete bakterite välismembraan kaitseb neid toksiliste molekulide, kaasa arvatud reaktiivsete hapniku molekulide (ROS) eest. Välismembraani läbilaskvuse vähenemine võib soodustada bakterite ellujäämist karmides tingimustes ning kaitsta neid antibiootikumide eest. (van der Heijden, Reynolds, *et al.*, 2016)

Metabolismil on oluline roll antibiootikumidega vahendatud surmamisel ning selle poolt tekitatud ROS võib samuti olla surmamisel oluline. Nimelt sõltub ROS-i mõju antibiootikumidega surmamisest katse tingimustest. Madal ROS-i kontsentratsioon põhjustab kaitsvaid reaktsioone ja resistentsust, kõrge kontsentratsioon võib olla surmav. Seega ROS-i tootmise suurendamine või kaitsemehhanismide mõjutamine võib viia uute ravimisvõimaluste avastamiseni, samas võib madalal kontsentratsioonil põhjustada bakterite resistentsust. (Van Acker ja Coenye, 2017)

On teostatud mitmeid erinevaid uuringuid, kus ühed näitavad, et bakteritsiidsete antibiootikumid tapavad bakteri, algatades bakteriaalse trikarboksüülhappe tsükli ja reaktiivsete hapnikuühendite tootmise, samal ajal kui teised uuringud on sellele vastuolus. (Fang, 2013)

Reaktiivsete hapnikuühendite rakusisese taseme kvantitatiivseks määramiseks *in vivo* ei ole otsest meetodi. Seega kasutatakse fluorestseini derivaati fluorestseinisotiotsüanaati (FITC). Selle

redutseeritud vormid võivad tungida rakkudesse, kus nende oksüdatsioon loob neist fluorestseeruva liigi, mida saab vaadelda näiteks mikroskoobiga. (Hassett ja Imlay, 2007)

Väite, et bakteritsiidsed antibiootikumid tapavad nii grampositiivseid kui ka gramnegatiivseid baktereid ületootes hüdroksüülradikaali, tõestamiseks teostati uuring, kus kasutati kolme enim tuntud antibiootikumi, milleks olid kinoloon, β -laktaam ja aminoglükosiid. (Kohanski *et al.*, 2007) Hüdroksüülradikaali moodustumise kiiruse määramiseks mõõdeti eeltoodud antibiootikumide juuresolekul hüdroksüülfenüül fluorestsensiini rakusisest oksüdatsiooni. Katsed näitasid, et antibiootikumidega töödeldud rakud fluorestseerusid rohkem hüdroksüülfenüül fluorestsensiini kui antibiootikumiga töötlemata rakud. (Hassett ja Imlay, 2007) Kasutati raua heterotsüklilisi ühendeid, mis blokeerivad Fentoni reaktsiooni, mis omakorda vähendab hüdroksüülradikaalide teket. Katses nähti, et antibiootikumide toksilisus vähenes nii raua heterotoksiliste ühendite kasutamisel kui ka hüdroksüülradikaalide kasutamisel. Rakkude tapmise kiirust mõjutasid ka muud tegurid nagu NADH tase ja raua-väavli kogus. Seega arvatakse, et antibiootikumid stimuleerivad rakkude hingamist ning selle tagajärjel moodustub ROS-e. (Kohanski *et al.*, 2007) Rakusisese vesinikperoksiidi ja superoksiidi moodustumise tagajärjel võivad tekkida hüdroksüülradikaalid. Sellest tulenev DNA oksüdatsioon võib olla surmav sündmus. (Hassett ja Imlay, 2007)

Eeltoodud uuringud on näidanud, et klassikalised antibiootikumid tapavad rakke stimuleerides ROS-i teket. Väite kontrollimiseks teostati 2013.aastal uuring, mis aga hüpoteesi ei kinnitanud. Antibiootikumi lisamine ei kiirendanud vesinikperoksiidi moodustumist *E.coli* 'is. Letaalsus püsis hapniku puudumisel ja DNA parandusmutandid ei olnud ülitundlikud. See ei toetanud ideed, et toksilisus tekkis oksüdatiivsete DNA kahjustuste tõttu. Seega võib järeldada, et antibiootikumid ei tekitanud ROS-i. (Imlay ja Liu, 2013)

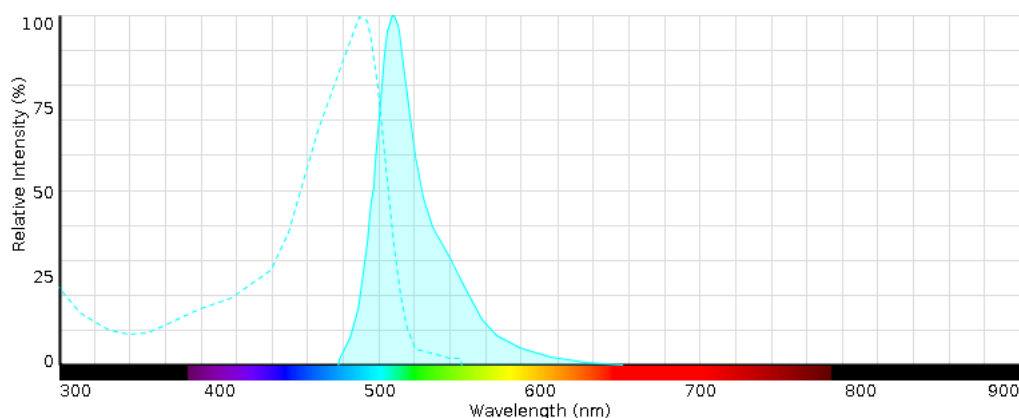
On teostatud katseid, kus bakteri rakke on eeltöödeldud natukene alla letaalse annuse H₂O₂-ga või nitrofuratoniiniga. Katse tulemuseks oli, et tekitati peaaegu samal hulgal kaitset nii nitrofuratoniini kui ka H₂O₂ vastu. (Basak ja Chatterjee, 1994) Samuti on teostatud katseid, kus bakteritele on lisatud antibiootikume nagu aminoglükosiid, fluorokinoloon ja β -laktaam ning mõõdetud oksüdatiivset stressi. Meetod tugines redoks-tundlikule GFP-le, mis võimaldas mõõta reaalselt H₂O₂ sissevoolu elavatesse bakteritesse ROS kokkupuute ajal ning määrata kindlaks regulatiivsed mehhanismid, mis muutsid ROS-i tundlikkust ja välismembraani läbilaskvust. Tulemused näitasid,

et antibiootikumid ei indutseeri ROS-i moodustumist bakterites, vaidlustades seega oksüdatiivse stressi rolli üldise surmamehhanismina. (van der Heijden, Vogt, *et al.*, 2016)

1.3. Fluorestseeruvad reportervalgud

1.3.1 Fluorotseeruvad valgud

Alates 1980. aastatest tekkis huvi, et kasutada fluorestseeruvaid molekule mikroskoopias. (Hibbs ja Hibbs, 2012) Üldiselt on fluorestseeruvaid ühendeid üsna vähe, kuid mõnesid ühendeid saab muuta fluorestseeruvaks fluorestsents-märgise lisamisega. Tavaliselt on fluorestseeruvatel ühenditel üks või mitu aromaatsset rühma. Fluorestsents-ühenditel on ergastus- ja emissioonispektrid. Ergastusspekter näitab, millised sissetulevad lainepikkused on lahusesse neeldunud ning emissiooni või fluorestsentsi spekter näitab, millised lainepikkused on emiteeritud peale sisenenud valguse neeldumist. (Hooijschuur, 2017) (Joonis 1) Spektrite intensiivsus või lainepikkus võivad muutuda temperatuuri, kontsentratsiooni või teiste molekulide koostoime tõttu. Mõned fluorofoorid on tundlikud lahuse keskkonnale, näiteks nagu pH, polaarsus või mõned ioonilised kontsentratsioonid. (Hibbs ja Hibbs, 2012)



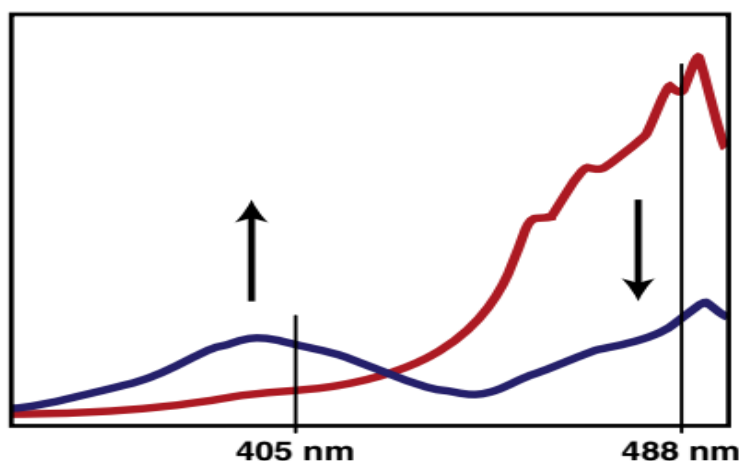
Joonis 1. GFP ergastus ja emissiooni spekter. (<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>)

Fluorestsentsvalkude (FP) arendamisel keskendutakse sinistest kuni kollaste valkude fotofüüsikalistele omadustele, mis pärinevad ainuõõnsest, *Aequorea victoria* roheliselt fluorestseeruvast valgust (GFP). Lisaks keskendutakse ka teistest organismidest pärinevate monomeersete FP-de arendamisele, mis emiteeruvad kollasest oranžini ja kuni punaste nähtavate valguspektriteni. (Shaner, Patterson ja Davidson, 2011) Fluorestsentsvalgul põhinevaid

indikaatoreid saab kujundada nii, et need reageeriksid erinevatele bioloogilistele sündmustele ja signaalidele. (Zhang *et al.*, 2002)

1.3.2. roGFP

roGFP on redutseerimis ja oksüdatsiooni tundlik GFP variant. (Müller *et al.*, 2017) roGFP-l on oluline roll redoks-biosensorina gramnegatiivsetes bakterites, et uurida redoks dünaamikat erinevates tingimustes. (van der Heijden, Vogt, *et al.*, 2016) Oksüdeeritud roGFP ergastub nii 365 nm juures kui ka 400 nm juures. (Vevea *et al.*, 2013) Maksimaalne oksüdeeritud roGFP ergastus toimub 405 nm ja redutseeritud vormi ergastus 488 nm juures, emission on mõlemal juhul 510 nm juures. (Ren ja Ai, 2013) (Morgan, Sobotta ja Dick, 2011) (Joonis 2)



Joonis 2. roGFP ergastusspektrid. Joonisel on kujutatud vertikaalteljel fluorestsents ($\text{AU} \times 10^3$) ning horisontaalteljel lainepikkused (nm). Punase joone korral on roGFP täielikult redutseerunud ning sinise joone korral täielikult oksüdeerunud. (Morgan, Sobotta ja Dick, 2011)

roGFP-Orp1 liitvalgus seob redokstundliku fluorestseeruva valguga roGFP2 H_2O_2 andurvalguga Orp1-ga. (Barata ja Dick, 2013) H_2O_2 võib tekitada Orp1-s disulfiidsideme, mis viiakse roGFP-sse disulfiidvahetuse mehhanismi abil. (Ren ja Ai, 2013) roGFP-Orp1 moodustumisel tekkivad disulfiidsillad stabiliseerivad valke. (Betz, 1993)



Joonis 3. roGFP2-Orp1 biosensori molekulaarne mehhanism. Orp1 kokkupuutumisel H_2O_2 -ga moodustab Orp1 domeen sulfeenhappe jäägi, mis muundatakse sama domeeni disulfiidsillaks. Toimub tiol-disulfiidi vahetus Orp1 ja roGFP vahel disulfiidsilla moodustumiseni. (Alekshun ja Levy, 2007)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Eelnevat arvesse võttes oli käesoleva töö eesmärgiks uurida seost antibiootikumide ja oksüdatiivse stressi vahel. Täpsemalt oli eesmärgiks konstrueerida reportertüved, mis ekspresseerivad roGFP või roGFP-Orp1 reportervalke, ning uurida kas ampitsiliin põhjustab rakkudele oksüdatiivset stressi.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja bakterite kasvutingimused

Reportersüsteemi uurimiseks kasutati töös tüve MG1655, mis pärineb *Escherichia coli*'st. Tüvi sai oma nimetuse Mark Guyer tüvest W1485. Tüves puudub F-plasmiid ja lambda faag. Sellel tüvel võib esineda kasvuprobleeme, kuid on vähe mutatsioone (Soupene *et al.*, 2003). Mg1655 kasvab LB (Luria-Bertanin) ja 0,4% glc (glükoos) MOPS (3-[N-morfoliin]propaansulfoonhape) söötmel. Täpsemalt kasutati kolme MG1655 tüve, millel olid erinevad plasmiidid (Tabel 1).

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved

Bakteritüved	Plasmiid	Allikas
roGFP	pSC101_roGFP	Käesolev töö
roGFP-Orp1	pSC101_roGFP_Orp1	Käesolev töö
noFP	pSC101_noFP	Mariliis Hinnu

Kloonimiseks kasutati käesolevas töös kompetentset mittepatogeenset *Escherichia coli* tüve DH5 α . DH5 α on mitmekülgne tüvi, mida kasutatakse üldistes kloonimis- ja subkloonimisrakendustes. (*E. coli* Wiki, 2012)

Söötmetena kasutati LB- söödet (Luria-Bertanin) ja 4% glc MOPS söödet. LB on väga laialdaselt kasutatav sööde, kuna see võimaldab paljudel liikidel kiiret ja head kasvu. LB puljong koosneb 10 g trüptonist, 5 g pärmiekstraktist, 10 g NaCl, ja 1 liitrist destilleeritud veest. Kasutatav LB sööde oli firma BDTM Difco™ Lennox oma. See valmistati vastavalt tootja juhendile ja steriliseeriti. Antud sööde toetab *E. coli* kasvu, mida saab mõõta 600 nm (OD₆₀₀) juures.

LB-söötmes on *E. coli* süsinikuallikaks kataboliseeritavad aminohapped. (Sezonov, Joseleau-Petit ja D'Ari, 2007) MOPS töödati välja enterobakterite jaoks. See toetab *E. coli* ja *Salmonella typhimurium*'i kasvu. (Neidhardt, Bloch ja Smith, 1974)

Vedelsöötme steriliseerimiseks kasutati filtrit, mille poori diameeter oli 0,22 µm. Vedelsööde filtreeriti, et tagada kõigil katsepäevadel sama söötme koostis. Valmistatud vedelsöödet hoiti 4 °C juures kuni üks nädal. 0,4% glc MOPS söötme valmistamiseks lahjendati 20% glükoos 0,4% glükoosiks ning kasutati 10X MOPS-i, mis lahjendati 1X MOPS-iks. Samuti tuli lisada 9,52 mM NH₄Cl ja 1,32 mM K₂HPO₄. Olemas olid aga mõlemad konsentratsioonil 1M. Seega tuli teha lahjendused.

2.2.2. Kasutatud antibiootikumid

Töös kasutati antibiootikumi ampitsiliin. Ampitsiliin häirib aktiivse replikatsiooni ajal rakuseina sünteesi, põhjustades bakteritsiidset toimet tundlike organismide vastu. (Hasan ja Mahdi, 2018) Ampitsiliini algkonsentratsioon oli 100 mg/ml. Antibiootikumi säilitati -20 °C juures.

Samuti kasutati antibiootikumi kanamütsiin. Selle algkonsentratsioon oli 50 mg/ml. Plasmidi selektsiooniks kasutati 0,05 mg/ml konsentratsiooniga kanamütsiini. Antibiootikumi säilitati -20 °C juures.

2.2.3. Kasutatud praimerid ja plasmiidid.

Antud uurimuses kasutatud praimerite nimetused ja järjestused on toodud tabelis 1. Konstrueeritud plasmiidid ja doonorplasmiidid on toodud tabelis 2 ning kujutatud lisas 1.

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Kirjeldus	Allikas
pQE-60roGFP2-Orp1-His	Omab inserti Orp1 ja roGFP2, resistentsusgeeni ampitsiliinile	(Gutscher <i>et al.</i> , 2009)
pSC101_roGFP_Orp1	Sisaldab reportergeeni Orp1 ja roGFP, resistentsusgeeni kanamütsiinile	Käesolev töö
pSC101_roGFP	Sisaldab reportergeeni roGFP ja resistentsusgeeni kanamütsiinile	Käesolev töö
pBC03_pSC101_pTIMER	Madala koopiaarvuga plasmiid, sisaldab resistentsusgeeni kanamütsiinile	(Claudi <i>et al.</i> , 2014)

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus	Inserdi/vektori praimer
pSC_RBS	CTCCTTCTTAAATCTA GAGGATCTCTATCAGCTC	Vektori praimer 1
pSC_STOP	TAGAAGCTTCGAGGTGAAGACGAAAG	Vektori praimer 2
roGFP_START_pSC_RBS	GAGCTGATAGAGATCCTCTAGATTTA AGAAGGAGAATTAACCATGGTGAGCAA GGGC	Inserdi praimer 1
roGFP_Orp1_pSC_STOP	CTTTCGTCTTCACCTCGAAGCT TCTAAGATCTTTCCACCTCTTTCAAAAG TTCTTC	Inserdi praimer 2
roGFP_pSC_STOP	CTTTCGTCTTCACCTCGAAGCT TCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	Inserdi praimer 3

2.2.4. PCR tingimused

PCR-i reaktsioon lõppmahuga 50µl sisaldas 5x *Phusion HF* Puhvrit 10 µl, dNTP-d 5 µl, 1 µl kumbagi praimerit, 0,5 µl *Phusion* DNA polümeraasi ja 1µl DNA-d (1ng/µl). Reaktsioon viidi läbi Eppendorf Mastercycler ep gradient S masinaga tabelis 4 toodud tingimustel.

Tabel 4. PCR-i programm

	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Algne denaturatsioon	96°C	10 minutit	1
DNA denaturatsioon	98°C	30 sekundit	25
Praimerite seondumine matriitsile	60°C	30 sekundit	
DNA süntees	72°C	2 minutit	
DNA süntees	72°C	5 minutit	
Järelsüntees	72°C	10 minutit	1

2.2.5 Geelektroforees

PCR-i produkte analüüsiti geelektroforeesil. Selleks lisati 30µl-ile PCR-i produktile 10 µl foreesivärvi. Antud segust kanti 30 µl igasse hambasse. Proovid kanti 1% agarosgeelile 1X TAE puhvris (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA, pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkonsentratsiooniga 1 µg/ml. Elektroforees toimus pingel 100 volti. DNA visualiseerimiseks kasutati ultravioletvalgust.

2.2.6. DNA puhastamine

Alguses lõigati agarosgeelilt väikesed tükid. Valiti need tükid, mis sisaldasid piisavas koguses DNA-d. Seejärel pandi 300 mg geelist mikrotsentrifuug tuubi ning lisati 500 µl FADF puhvrit. Segu segati keerisseguril. Seejärel inkubeeriti seda 55 °C 5-10 minutit, seejuures segades seda iga 3 minuti tagant keerisseguril. Lasti jahtuda. 800 µl segust pandi FADF kolumnisse, tsentrifuugiti 11 000 rpm 30 sekundit ning korrati. Sellele lisati 750 µl *Wash Bufferit*, tsentrifuugiti 11 000 rpm 30 sekundit, millele järgnes uus tsentrifuugimine 18 000 rpm 3 minutit. FADF tuub pandi epsi, kuhu lisati 40 µl voolutuspuhvrit. Tsentrifuugiti 1 minut 18 000 rpm. Seejärel mõõdeti DNA konsentratsiooni Nanodrop spektromeetriga.

2.2.7. CPEC tingimused

CPEC-is (*circular polymerase extension cloning*) kasutati esimest ja teist DNA-d. Segu lõppmahuga 20 µl sisaldas 4 µl *Phusion HF* puhvrit, 2mM dNTP-d, 5 µl vektor DNA-d ja 4 µl fragmendi DNA-d. Vektor DNA maht lahuses sõltub nende suurusest ning see tuli välja arvutada. Insert ja Vektor DNA suhe peab olema 1:1. Seega lõplik kogus 20µl kohta oli vektoril ligikaudu 110 ng. CPEC- i programmi parameetrid on toodud tabelis 5.

Tabel 5. CPEC-i programm

Tsükl	Ahelate lahtisulamine	Fragmentide paardumine	DNA süntees (15 s/kb)
1. tsükl	98 °C, 30 sekundit	70 °C – 55 °C, 3 minutit ja 30 sekundit	72 °C, 88 sekundit
2.- 31. tsükl	98 °C, 10 sekundit	70 °C – 55 °C, 3 minutit ja 30 sekundit	72 °C, 88 sekundit
3. tsükl	98 °C, 30 sekundit	70 °C – 55 °C, 3 minutit ja 30	72 °C, 5 minutit

2.2.8. Transformeerimine DH5α rakkudesse

Transformatsiooniks võeti 7 µl CPEC-i reaktsiooni produkti ning lisati 100 µl-le *E. coli* tüvede DH5α kompetentidele jääl. Neid hoiti jääl 30 minutit. Seejärel teostati kuumašokk 42 °C 45 sekundit. Seda tehti inkubaatoris Eppendorf Thermomixer Compact. Rakud pandi tagasi jääle ligikaudu 10-ks minutiks jahtuma. Lisati 900 µl LB söödet ning pandi tagasi inkubaatorisse 60-ks minutiks 37 °C juurde inkubeerima, loksutades 225 rpm. Seejärel tsentrifuugiti rakkusid maksimaalsel kiirusel (13,2X 1000 rpm) 30 sekundit. Eemaldati suurem osa vedelikust ning ülejäänud suspenderiti ning plaaditi LB-tassidele ning viidi 37 °C kappi üleöö kasvama.

Selleks, et kolooniat edasi külvata kasutati Fluoro/phosphoimager Typhoon Trio W/Workstation masinat, mille abil tehti kindlaks positiivne fluorestsents. Roheliselt fluorestseeruva valguga ergastamiseks kasutati 488 laserit ning mõõdeti 526 nm juures emissiooni.

2.2.9. Plasmidse DNA eraldamine

Plasmidse DNA eraldamiseks kasutati firma Favorgen plasmidi eralduse komplekti FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit, järgides selle tootja protokoll. Seejärel transformeeriti puhastatud plasmid *E. coli* tüvesse MG1655.

2.2.10. DMSO säilituskultuuride tegemine

Bakterikoloonia pandi üleöö kasvama 10 ml LB söötmesse, millele lisati 10 µl kanamütsiini (25mg/ml). Järgmisel päeval tehti kultuurist lahjendused, et OD₆₀₀ oleks 0,05. Seejärel kasvatati rakke, kuni optilise tiheduseni 0,6-0,8. Säilituskultuuride valmistamiseks võeti 80 µl DMSO (dimetüülsulfoksiid) lahust ja 920 µl bakterirakke. See jaotati 120 µl kaupa väikestesse epsidesse ning viidi -80 °C külmkappi.

2.2.11. Reporterite valideerimine

Võeti DMSO säilituskultuurid. Mikroplaadi jaoks kasvatati rakke ette 100 ml kolbides. Kolbidesse lisati 10 ml söödet, 100 µl säilituskultuuri ning 10 µl antibiootikumi kanamütsiini (25 mg/ml). Kasvatamine viidi läbi kahe tunni jooksul Sanyo OrbiSafe loksutis 37 °C juures kiirusel 200 rpm. Kui rakud jõuavad eksponentsiaalsesse faasi pannakse need lõppkonsentratsiooniga 10⁶ CFU/ml mikrotiiterplaadi kannu. Sinna pandi 50 µl söödet koos ampitsiliiniga ja 50 µl rakke.

Kasutati 96-kohalist kaanega mikrotiiterplaati. Kasutati kahte erinevat söödet, 0,4% glc MOPS-i ja LB-d. Rakkudest kasutati noGFP-d, GFP-d ja GFP-Orp1, millest igaüks lisati nii 0,4% glc MOPS söötmele kui ka LB-le. Ampitsiliini lisati erinevatel kontsentratsioonidel. Kõige kõrgem kontsentratsioon oli 16 µg/ml ja madalaim oli 0,025 µg/ml. Samuti oli kontrolliks igal rakul kolm tühja ehk ampitsiliini vaba proovi.

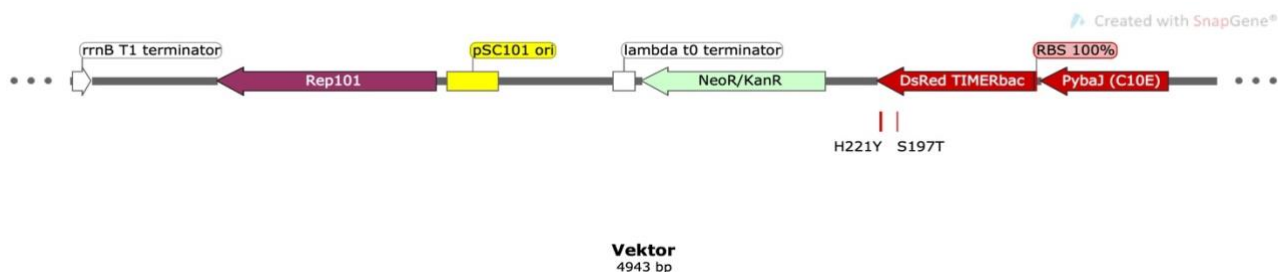
Mikrotiiterplaat pandi 20-ks tunniks BioTek SynergyMX mikroplaadi lugejasse. Seade oli vormistatud 37 °C juurde ja loksutiskiirus oli keskmine. Mõõtmised toimusid 15 minutiliste vahedega. Bakterite optilist tihedust mõõdeti 600 nm juures. Nii roGFP kui roGFP-Orp1 fluorestsentsi kahel erineval tingimusel. Oksüdeerunud vormi ergastati 400/ +/- 9,0 nm juures ja emissiooni mõõdeti 510/ +/- 9,0 nm juures, tundlikkuseks oli 100 (inglise keeles *gain*). Redutseerunud vormi ergastati 490 +/- 9 nm juures ja emissiooni mõõdeti 510/ +/- 9 nm juures, tundlikkusega 100.

2.3. Tulemused ja arutelu

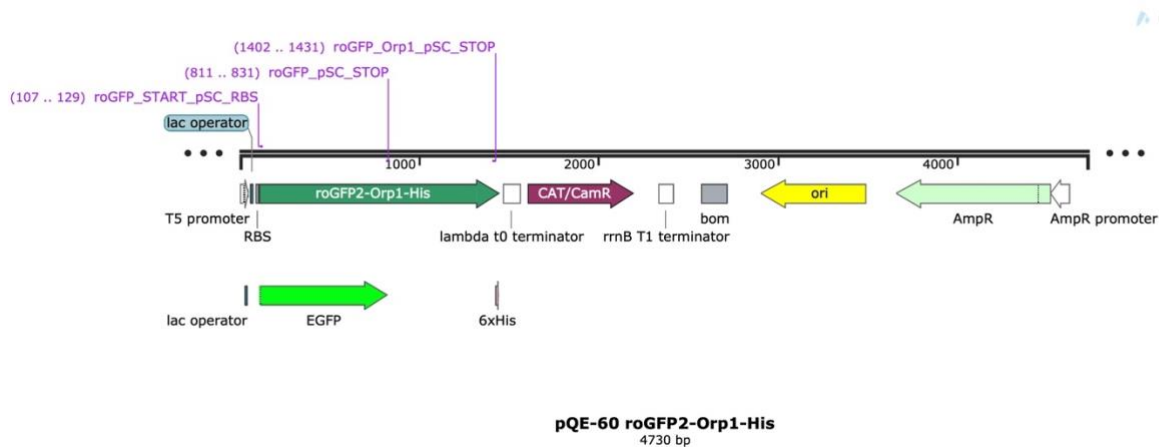
2.3.1. Reporterplasmiidide konstrueerimine

Kuna kirjanduse ülevaatest lähtudes on vastuolus arvamus antibiootikumide ja oksüdatiivse stressi suhtes erinevad otsustati konstrueerida reporterplasmiidid pSC101_roGFP-Orp1, mis ekspresseeris redokstundlikku fluorestseeruvat Orp1-roGFP liitvalku ja pSC101-roGFP, mis ekspresseeris roGFP valku, mis oli redokstundlik ja samuti fluorestseeruv.

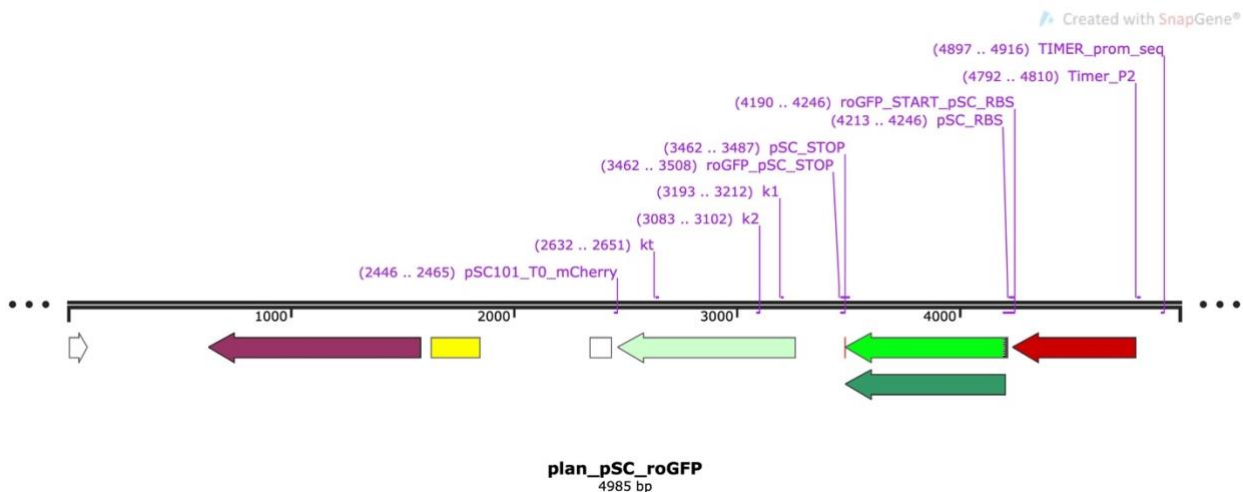
Ülal toodud PCR tingimustega paljundati järgmiste praimeritega lõike järgmistes plasmiidides. Esiteks vektorit pBC03_pSC101_pTIMER (Joonis 4), kasutades praimereid pSC_RBS ja pSC_STOP. Lisaks paljundati kaks erinevat insertiooni-fragmenti plasmiidilt pQE-60 roGFP2-Orp1-His (Joonis 5). Lühike, ainult roGFP-d sisaldav fragment amplifitseeriti kasutades praimereid roGFP_START_pSC_RBS ja roGFP_pSC_STOP (joonis 6). Teiseks pikem fragment, mis sisaldas lisaks roGFP-le ka Orp1 operoni (joonis 5), amplifitseeriti kasutades praimereid roGFP_START_pSC_RBS ja roGFP_Orp_pSC_STOP. Täielikud plasmiidikaardid on välja toodud Lisa 1.



Joonis 4. Vektor plasmiid pBc03_pSC101_pTIMER



Joonis 5. Insert 1 pQE-60 roGFP2-Orp1-His



Joonis 6. pSC_roGFP

Töös konstrueeriti kaks plasmidi. Nimelt ühendati plasmiidide osad (vektor ja insert) ühtseks plasmiidiks. See toimus CPEC-i käigus. Plasmidi pSC101_roGFP jaoks lisati 5 µl vektorit ning 4 µl inserti. Plasmidi pSC101_roGFP_Orp1 jaoks segati kokku 5 µl vektorit ja 2,7 µl inserti. Plasmidi kaardid on lisatud LISA 1. Kuna CPEC-i saaduse transformatsioon *E. coli* DH5α tüvesse oli edukas, siis võib sellest järeldada, et CPEC oli samuti edukas.

2.3.2. *E.Coli* tüves MG1655 rakkude reporterplasmiidide kontrollimine

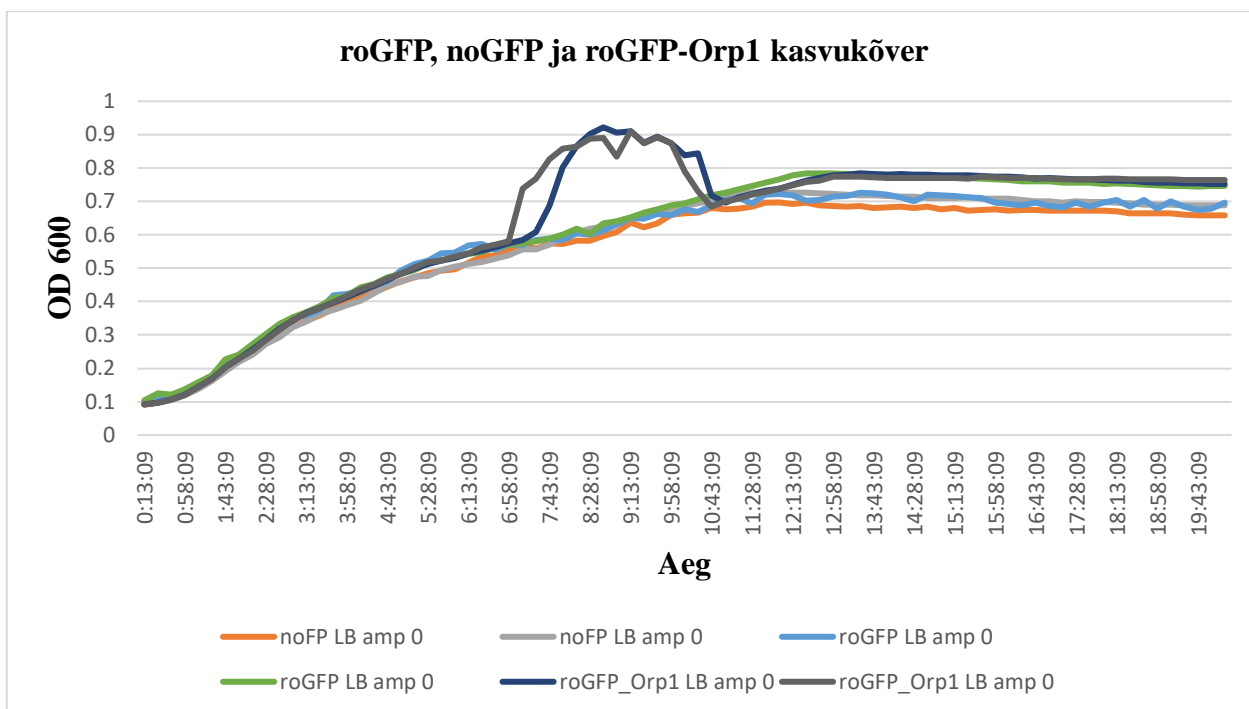
Selleks, et kolooniaid edasi külvata ja puhastada tuli mõõta nende fluorestsentsi. Valiti roGFP-d ekspresseerivad kolooniad positiivse fluorestsentsi järgi. Kasutati masinat Fluoro/phosphoimager

Typhon Trio W/Workstation. GFP emissiooni mõõdeti 526 nm juures ning ergastamiseks oli laser 488. Seejärel eraldati plasmiidne DNA ning teostati *E.coli* tüvesse MG1655 transformatsioon.

2.3.3. Antibiootikumidega reporterplasmiidide kontrollimine

Viimasena teostati mikrotiiterplaadilugejaga katse, kus taheti vaadata, kas antibiootikumid avaldavad bakterite kasvule mõju ning kuidas need mõjuvad roGFP oksüdeerumise tasemele. Mikrotiiterplaadile pandi bakterid nii LB söötmesse kui ka 0,4% glc MOPS söötmesse, lisati ka antibiootikumi ampitsiliin erinevatel kontsentratsioonidel. Masin BioTek SynergyMX seati keskmise väristuskiirusega 37 °C juurde 20-ks tunniks.

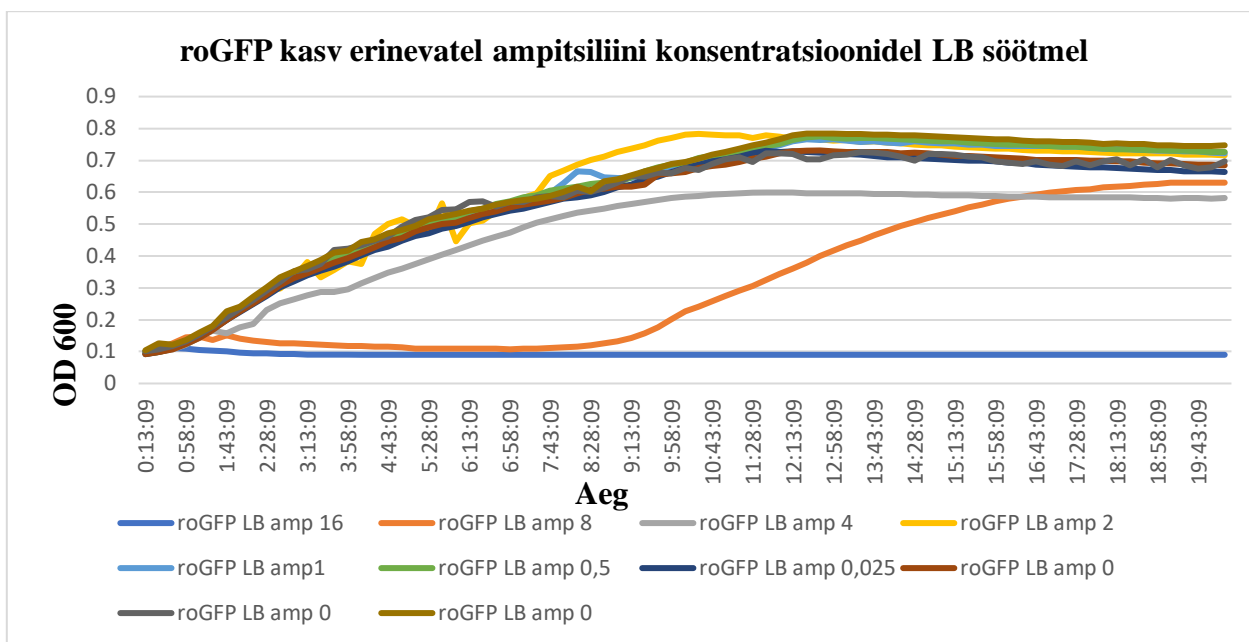
Katses kasutati kolme *E. coli* MG1655 tüve, millel olid erinevad plasmiidid. Esimene tüvi oli reportertüvi roGFP, täpsemalt *E. coli* MG1655 rakud plasmiidiga pSC101_roGFP, mis oli fluorestseeruv ja sisaldas redokstunlikku valku. Teiseks oli reportertüvi roGFP-Orp1, täpsemalt *E. coli* MG1655 rakud plasmiidiga pSC101_roGFP_Orp1, mis oli fluorostseeruv ning sisaldas roGFP-Orp1 liitvalku. Kolmandaks tüveks oli noFP ehk kontroll-tüvi, mille abil mõõdeti autofluorestsentsi, täpsemalt *E. coli* MG1655 rakud plasmiidiga pSC101_noFP.



Joonis 7. roGFP, noGFP ja roGFP-Orp1 kasvukõver. Rakud kasvasid LB söötmel 37 °C juures 20 tundi. Antud kasvukõveral on kujutatud kõigi kolme tüve optilise tiheduse kasvu sõltuvalt ajast. Horisontaalteljel on kujutatud aeg ning vertikaalteljel on kujutatud OD₆₀₀ nm juures. Kasutatud on lühendit amp 0, mis näitab, et ampitsiliini kontsentratsioon on 0 µg/ml.

Vaadeldi *E.coli* MG1655 kolme tüve kasvu lainepikkusel 600 nm (joonis 7). Antud tulemuste põhjal ei saa järeldada, et roGFP ekspressioon aeglustab kuidagi kasvu. Küll aga ei ole kõik kasvukõverad sarnased, kuna roGFP-Orp1 optiline tihedus kasvab järsult ajahetkel 7:43 ja hakkab paari tunni pärast langema. Tegemist võib olla õhumulliga, küll aga esineb seda kõigil kolmel roGFP-Orp1 ampitsiliin 0 µg/ml proovil. MOPS söötmel seda aga ei esinenud.

Kuna joonise 7. Põhjal ei saanud järeldada, et roGFP ekspressioon kuidagi aeglustaks kasvu valiti esitamiseks ainult roGFP tüve kasv erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel, LB söötmetel (joonis 8).



Joonis 8. roGFP kasv erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel LB söötmel. Rakud kasvasid LB söötmel 37 °C juures 20 tundi. Antud kasvukõveral on kujutatud roGFP optilise tiheduse suurenemist sõltuvalt ajast. Horisontaalteljel on kujutatud aega ning vertikaalteljel OD₆₀₀ nm juures. Lühenditena on kasutatud amp 16amp kuni 0amp, mis tähendavad ampitsiliini kontsentratsioone 16 µg/ml kuni 0 µg/ml.

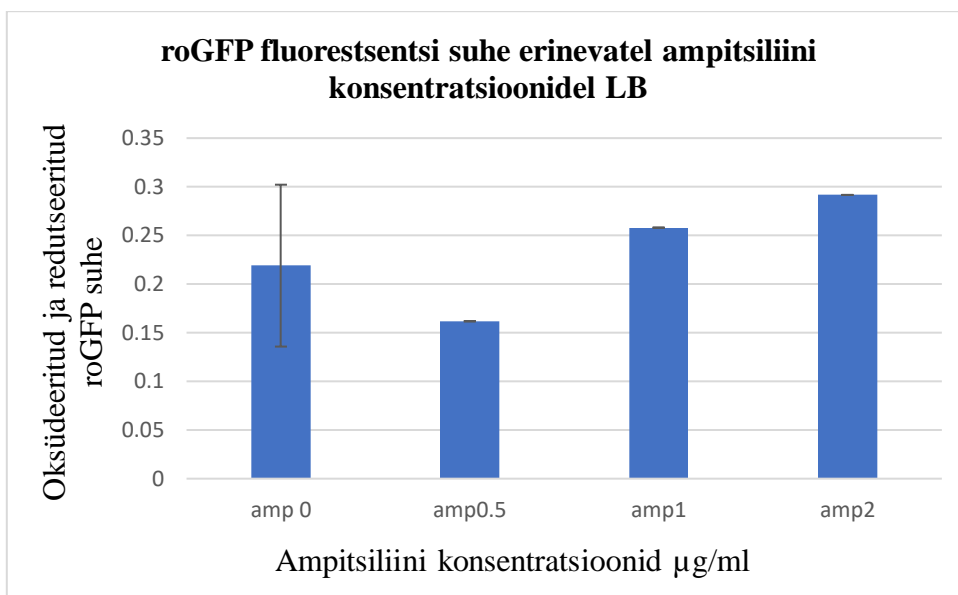
Jooniselt 8 on näha, et antibiootikumi kontsentratsioonil 16 µg/ml ei hakka roGFP üldse kasvama, samuti hakkab hiljem kasvama ka kontsentratsioonil 8 µg/ml ning kasv on väiksem kontsentratsioonil 4 µg/ml.

Optilist tihedust mõõtes hinnati rakkude kasvu, kuid lisaks sellele mõõdeti ka fluorestsentsi. Fluorestsentsi mõõtmisel roGFP ergastus toimus esimese filtriga 400/+/-9 nm juures, teise filtriga 490/+/-9 nm juures. Analüüsid teostati kõikidel antibiootikumide kontsentratsioonidel alates 0 µg/ml kuni 16 µg/ml. Kõigepealt arvutati iga tüve keskmine ampitsiliini kontsentratsioonil 0 µg/ml, kuna sellel kontsentratsioonil oli kolm kordust. Seejärel arvutati oksüdeeritud roGFP signaal, mis saadi kui reporterist lahutati autofluorestsentsi kontroll-tüvi, kasutati 405/+/-9 ergastusel saadud tulemusi. Siis arvutati redutseeritud roGFP signaal, mille korral kasutati ergastuse 490/+/-9 tulemusi ning lahutati reportertüvest kontroll-tüve autofluorestsents. Viimasena arvutati oksüdeeritud ja redutseeritud roGFP suhe. Arvutuskäigu selgitus on tabelis 6.

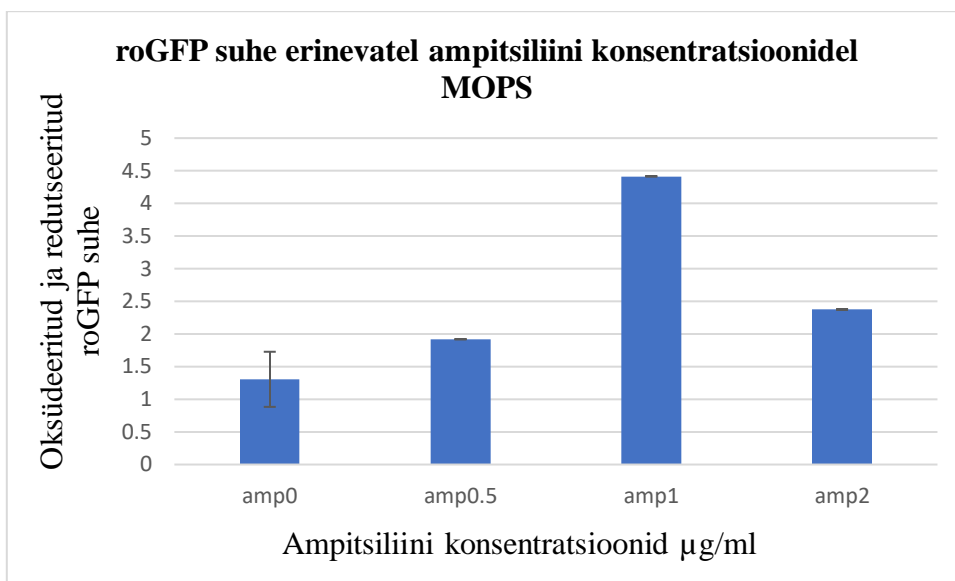
Tabel 6. Oksüdeeritud ja redutseeritud roGFP suhte arvutuskäik.

Bakteritüvi	Em510+/- 9(ergastus 405+/-.....)	Em510+/- 9(ergastus 490+/-.....)	Oksüdeeritud roGFP signaal	Redutseeritud roGFP signaal	Oksüdeeritud ja redutseeritud ro GFP suhe
roGFP (reporter)	X1	X2	X1-Z1	X2-Z2	(X1-Z1)/(X2-Z2)
rpGFPorp1 (reporter)	Y1	Y2	Y1-Z1	Y2-Z2	(Y1-Z2)/(Y2-Z2)
noFP (autofluorestsentsi kontroll-tüvi)	Z1	Z2	-	-	-

Arvutuste tulemuste põhjal koostati roGFP kohta kaks graafikut, üks oli 0,4% glc MOPS söötmel saadud tulemuste kohta (Joonis 9), teine LB söötmel saadud tulemuste kohta (Joonis 8). Joonisel kuvati ampitsiliini kontsentratsioonidel 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ja 2 µg/ml saadud tulemusi. Lisaks tehti arvutuste tulemuste põhjal ka kaks graafikut roGFP-Orp1 kohta. Üks oli samamoodi 0,4% glc MOPS söötmel saadud tulemuste kohta (Joonis 10), teine oli LB söötmel saadud tulemuste kohta (Joonis 11). Nendel joonistel kuvati ampitsiliini kontsentratsioonidel 0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml ja 4 µg/ml. Kõrgemaid ampitsiliini kontsentratsioone ei saanud kasutada, kuna nende väärtus oli negatiivne, nimelt tuli autofluorestsentsi maha lahutamisel negatiivne väärtus.



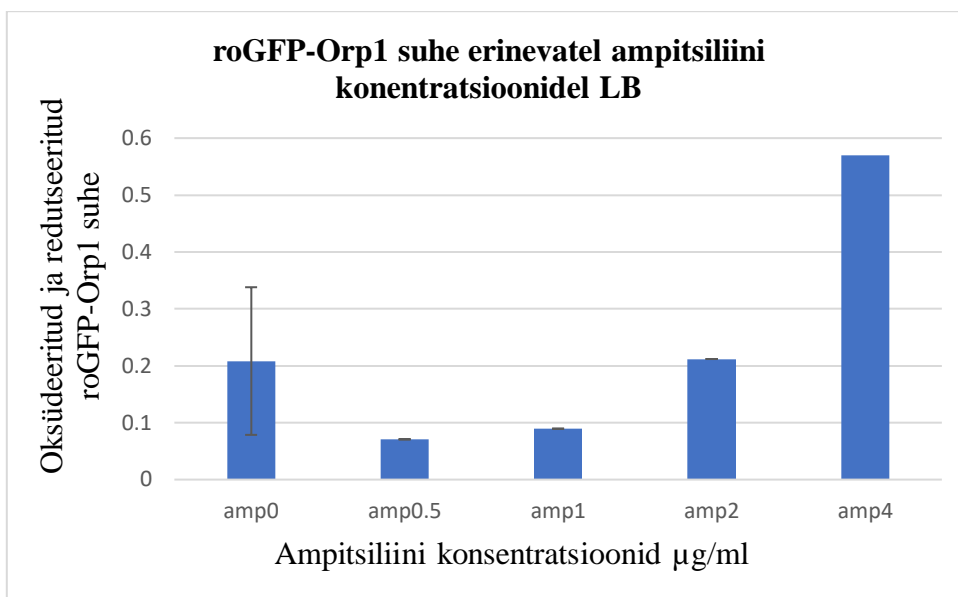
Joonis 9. roGFP fluorestsentsi suhe erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel LB. Joonisel 9 on kujutatud oksüdeeritud ja redutseeritud roGFP suhet vastavalt ampitsiliini kontsentratsioonidele. Kasutatud lühendid: amp 0, amp 0,5, amp 1 ja amp 2 tähendavad ampitsiliini kontsentratsioonid 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ja 2 $\mu\text{g/ml}$. Tulbale amp 0 on lisatud kolme ampitsiliini 0 $\mu\text{g/ml}$ katse standardhälve. Katse on läbi viidud LB söötmel.



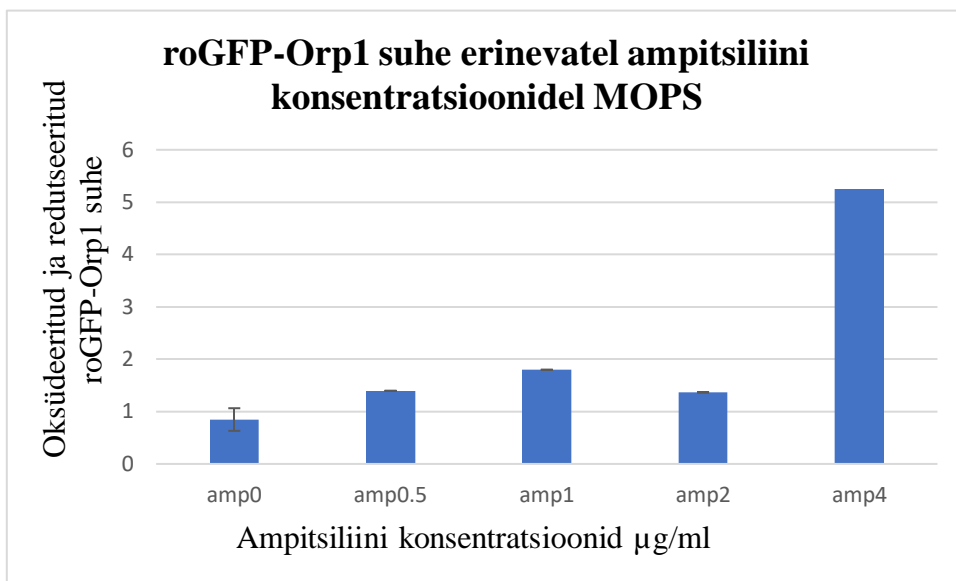
Joonis 10. roGFP fluorestsentsi suhe erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel MOPS.

Joonisel 10 on kujutatud roGFP fluoresteerumise oksüdeeritud ja redutseeritud suhet vastavalt ampitsiliini kontsentratsioonidele. Kasutatud lühendid amp 0, amp 0,5, amp 1 ja amp 2 tähendavad ampitsiliini kontsentratsioonid 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ja 2 $\mu\text{g/ml}$. Tulbale amp 0 on lisatud kolme ampitsiliini 0 $\mu\text{g/ml}$ katse standardhälve. Katse on läbiviidud 0,4% glc MOPS söötmel.

Jooniselt 9 on näha, et erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel jääb oksüdeeritud ja redutseeritud roGFP suhet ilma antibiootikumita kasvanud rakkudest mõõdetud suhte standardhälbe piiridesse. Seega LB söötmel ampitsiliin ei avalda erinevatel kontsentratsioonidel mõju plasmiidis pSC101_roGFP olevale redoksvalgule. Jooniselt 10 on näha, et kui rakud kasvavad 0,4% glc MOPS söötmes siis oksüdeeritud/redutseeritud roGFP suhe muutus antibiootikumi lisades võrreldes antibiootikumita prooviga. Sellest võib järeldada, et 0,4% glc MOPS söötmel ampitsiliin avaldas mõju roGFP reporterile.



Joonis 11. roGFP-Orp1 suhe erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel LB. Joonisel 11 on kujutatud roGFP-Orp1 fluoresteerumise oksüdeeritud ja redutseeritud suhet vastavalt ampitsiliini kontsentratsioonidele. Kasutatud lühendid amp 0, amp 0,5, amp 1, amp 2 ja amp 4 tähendavad ampitsiliini kontsentratsioonis 0 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ ja 4 $\mu\text{g/ml}$. Tulbale amp 0 on lisatud kolme ampitsiliini 0 $\mu\text{g/ml}$ katse standardhälve. Katse on läbiviidud LB söötmel.



Joonis 12. roGFP-Orp1 suhe erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel MOPS. Joonisel 10 on kujutatud roGFP-Orp1 fluoresteerumise oksüdeeritud ja redutseeritud suhet vastavalt ampitsiliini kontsentratsioonidele. Kasutatud lühendid amp 0, amp 0,5, amp 1, amp 2 ja amp 4 tähendavad ampitsiliini kontsentratsioonis 0 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ja 2 $\mu\text{g/ml}$. Tulbale amp 0 on lisatud kolme ampitsiliini 0 $\mu\text{g/ml}$ katse standardhälve. Katse on läbiviidud 0,4% glc MOPS söötmel.

Järgnevalt vaadeldi teist reporterit, kus roGFP oli seotud Orp1 valguga. Tulemused on joonistel 10 ja 11. Jooniselt 10 on näha, et antibiootikumid kontsentratsioonidel 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ja 2 $\mu\text{g/ml}$ ei avalda mõju reporterile roGFP-Orp1-le, kuna oksüdeeritud/redutseeritud roGFP-Orp1 suhte väärtus jääb ampitsiliini kontsentratsioonil 0 $\mu\text{g/ml}$ väärtuste standardhälbe piiridesse. Küll on aga tõusnud suhe tunduvalt ampitsiliini kontsentratsioonil 4 $\mu\text{g/ml}$. Seega on näha, et plasmiidis pSC101_roGFP_Orp1 olev Orp 1 reporter avaldab mõju roGFP-le, kuna ampitsiliini kontsentratsiooni kasvamisel LB söötmel erineb ampitsiliini kontsentratsiooniga 4 $\mu\text{g/ml}$ 3x ampitsiliiniga 0 $\mu\text{g/ml}$ proovist. Jooniselt 12 on näha, et kõik kontsentratsioonid jäävad välja ilma ampitsiliinita proovi standardhälbest. Seega saab järeldada, et roGFP_Orp1 reporter on tundlikum kui roGFP(joonis 10).

Tulemused näitasid, et suurematel antibiootikumide kontsentratsioonidel oli suurem fluorestsentside suhe. Ainsana ei näidanud selliseid tulemusi roGFP LB söötmel, 0,4% glc MOPS söötmel oli aga kontsentratsioonil 1 µg/ml ja 2 µg/ml muutuseid näha. Seega võib järeldada, et mõlema bioreporterite puhul signaal kasvas ning nii roGFP-Orp1 liitvalk kui ka roGFP valk üksi töötasid ning võis täheldada oksüdatiivse stressi teket.

Fluorestsentsi mõõtmiselt teostatud katse tulemustest võib järeldada, et roGFP ekspresseerus. Samuti muutusid nii roGFP kui ka roGFP-Orp1 puhul oksüdeeritud ja redutseeritud suhe. Paremini olid tulemused eristatavad roGFP-Orp1 puhul. Seega tuleks edaspidistes katsetustes kasutada just seda bakteritüve.

Kuna fluorestsentsi suhted suurenesid kõrgemal ampitsilliini kontsentratsioonil, siis sellest võiks järeldada, et ampitsilliin põhjustas rakkudele oksüdatiivset stressi. Sarnaseid uuringuid on läbi viidud mitmeid, kus ühed näitavad, et bakteritsiidsed antibiootikumid tapavad bakteri ning algatavad reaktiivsete hapnikuühendite tootmise, samal ajal kui teised uuringud näitavad vastupidist. (Van Acker ja Coenye, 2017)

Antud bakalaureuse tööga sarnased tulemused sai ka Kohanski *et al.* ning Basak ja Chatterjee. (Kohanski *et al.*, 2007) (Basak ja Chatterjee, 1994) Antud bakalaureuse tööga vastastikused tulemused on saanud aga van der Heijden, Vogt, *et al.* (van der Heijden, Vogt, *et al.*, 2016) ja Imlay ja Liu. Erinevad tulemused võivad tulla eksperimentaalsete protokollide erinevusest.

Antud bakalaureuse töös kasutati ainult ühte antibiootikumi, seega tuleks teha lisakatsetusi teiste antibiootikumidega ning katsetada erinevaid kontsentratsioone. Võiks ka katseid sooritada erinevatel kasvutingimustel ning kindlasti võiks kontrolliks lisada söötmele H₂O₂ või DTT-d (ditiotreitool), mis vastavalt oksüdeerub või redutseerub reportervalgu.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida antibiootikumide ning oksüdatiivse stressi seost. Täpsemalt oli eesmärgiks luua kaks bioreporterit, mille abil saaks mõõta kas antibiootikumi ampitsiliini erinevate kontsentratsioonide lisamisel keskkonda tekib oksüdatiivset stressi.

Antud töös transformeeriti *Escherichia coli* tüvesse MG1655 kaks konstrueeritud plasmidi. Üheks plasmiidiks oli pSC_101_roGFP, mis sisaldas roheliselt fluorestseeruvat valku ning teiseks plasmiidiks oli pSC101_roGFP_Orp1, mis sisaldas lisaks fluorestseeruvale valgule ka valku Orp1. Mõlemas konstrueeritud tüves oli kogu aeg ekspressioon olemas.

Reporterid töötasid ning nende signaali määrati fluorestsentsi suhte alusel. Mõõtmise teostati mikrotiiterplaadilugejaga ning rakkude kasvu erinevatel ampitsiliini kontsentratsioonidel vaadeldi samuti mikrotiiterplaadilugejaga. Kasvu vaadeldi lainepikkusel 600 nm. roGFP ergastus toimus esimese filtriga 400 \pm 9 nm juures, teise filtriga 490 \pm 9. Analüüsid teostati kõikidel antibiootikumide kontsentratsioonidel alates 0 μ g/ml kuni 16 μ g/ml. Tulemustest võis järeldada, et ampitsiliin põhjustas rakkudele oksüdatiivset stressi ja see oli detekteeritav nii roGFP-le kui ka roGFP-Orp1 reporteritega, küll aga olid tulemused paremini eristutavad roGFP-Orp-1.

Edaspidi võiks katsetada erinevaid antibiootikume, erinevatel kontsentratsioonidel ning erinevaid kasvutingimusi ning lisada kontrolliks DTT-d või H₂O₂.

Detection of oxidative stress with fluorescent bioreporter in *Escherichia coli* in presence of ampicillin

Johanna Liis Udumets

SUMMARY

The aim of this work was to investigate the link between antibiotics and oxidative stress. Specifically, the aim was to create two bioreports that could be used to measure whether oxidative stress would be present when different concentrations of ampicillin were added to the environment.

In this work, two constructed plasmids were transformed into *Escherichia coli* strain MG1655. One plasmid was pSC_101_roGFP, which contained a roGFP, and the second plasmid was pSC101_roGFP_Orp1, which included the Orp1 protein in addition to the fluorescent protein. There was always expression in both engineered cells.

Reporters worked and their signal was determined by the fluorescence ratio. The measurement was performed with a microtiter plate reader and the growth of the cells at various ampicillin concentrations was also observed with a microtiter plate reader. Growth was observed at 600 nm. roGFP excitation was performed with first filter at 400 +/- 9 nm, with second filter at 490 / + / - 9. Assays were performed at all antibiotic concentrations from 0 µg / ml to 16 µg / ml. The results suggested that ampicillin caused oxidative stress to bacteria and that was detectable with both roGFP and roGFP-Orp1, but the results were more identifiable on roGFP-Orp1.

Further tests could be performed with various antibiotics at different concentrations and different growth conditions could also be tested and added DTT or H₂O₂ for control.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat Marta Putrinšit, kes abistas katsete läbiviimisel, tulemuste analüüsimisel ning antud bakalaureusetöö koostamisel. Samuti soovin tänada Mariliis Hinnut, kes vastas tekkinud küsimustele ning vajadusel andis nõu ja suunas.

KIRJANDUSE LOETELU

Van Acker, H. ja Coenye, T. (2017) „The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria“, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 25(6), lk 456–466. doi: 10.1016/j.tim.2016.12.008.

Alekshun, M. N. ja Levy, S. B. (2007) „Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance.“, *Cell*, 128(6), lk 1037–50. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.004.

Barata, A. G. ja Dick, T. P. (2013) „Chapter Four - In Vivo Imaging of H₂O₂ Production in *Drosophila*“, *Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part A*, Volume 526(0), lk 61–82. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405883-5.00004-1>.

Basak, J. ja Chatterjee, S. N. (1994) „Induction of adaptive response by nitrofurantoin against oxidative DNA damage in some bacterial cells“, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 321(3), lk 127–132. doi: 10.1016/0165-1218(94)90036-1.

Betz, S. F. (1993) „Disulfide bonds and the stability of globular proteins“, *Protein Science*, 2(10), lk 1551–1558. doi: 10.1002/pro.5560021002.

Birben, E. *et al.* (2012) „Oxidative stress and antioxidant defense“, *World Allergy Organization Journal*, 5(1), lk 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Bush, K. ja Bradford, P. A. (2016) „ β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview“, (Table 1).

Claudi, B. *et al.* (2014) „Phenotypic variation of salmonella in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy“, *Cell*, 158(4), lk 722–733. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.045.

D’Autréaux, B. ja Toledano, M. B. (2007) „ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 8, lk 813. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2256>.

Dahal, R. H. ja Chaudhary, D. K. (2018) „Microbial Infections and Antimicrobial Resistance in Nepal: Current Trends and Recommendations“, *The Open Microbiology Journal*, 12(1), lk 230–242. doi: 10.2174/1874285801812010230.

Domingues, S., da Silva, G. J. ja Nielsen, K. M. (2012) „Integrins: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria“, *Mobile Genet Elements*, 2(5), lk 211–223. doi: 10.4161/mge.22967.

Ezelarab, H. A. A. *et al.* (2018) „Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents“, *Archiv der Pharmazie*, 351(9), lk 1800141. doi: doi:10.1002/ardp.201800141.

Fang, F. C. (2013) „Antibiotic and ROS linkage questioned“, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 31(5), lk 415–416. doi: 10.1038/nbt.2574.

Gasbarre, C. C., Schmitt, S. K. ja Tomecki, K. J. (2012) „Chapter 230. Antibiotics“, Goldsmith, L. A. *et al.* (toim) *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 8e. New York, NY: The McGraw-Hill Companies. Available at: <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=56100541>.

Gleckman, R., Blagg, N. ja Joubert, D. W. (1981) „Trimethoprim: Mechanisms of Action, Antimicrobial Activity, Bacterial Resistance, Pharmacokinetics, Adverse Reactions, and Therapeutic Indications“, *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 1(1), lk 14–19. doi: 10.1002/j.1875-9114.1981.tb03548.x.

Gutscher, M. *et al.* (2009) „Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases“, *Journal of Biological Chemistry*, 284(46), lk 31532–31540. doi: 10.1074/jbc.M109.059246.

Hansen, S. *et al.* (2008) „Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia coli Specialized Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in Escherichia coli“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(24), lk 560–566. doi: 10.1128/JB.186.24.8172.

Hasan, R. M. ja Mahdi, B. M. (2018) „Role of Antimicrobial Agents in the Management of Perianal Abscess“, *New Concepts in the Management of Septic Perianal Conditions*. Academic Press, lk 71–77. doi: 10.1016/B978-0-12-816111-1.00007-0.

Hassett, D. J. ja Imlay, J. A. (2007) „Bactericidal Antibiotics and Oxidative Stress: A Radical Proposal“, *ACS Chemical Biology*. American Chemical Society, 2(11), lk 708–710. doi: 10.1021/cb700232k.

van der Heijden, J., Vogt, S. L., *et al.* (2016) „Exploring the redox balance inside gram-negative bacteria with redox-sensitive GFP“, *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 91, lk 34–44. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.11.029.

van der Heijden, J., Reynolds, L. A., *et al.* (2016) „Salmonella rapidly regulates membrane permeability to survive oxidative stress“, *mBio*, 7(4), lk 1–11. doi: 10.1128/mBio.01238-16.

Hibbs, A. R. ja Hibbs, A. R. (2012) „What is Fluorescence?“, *Confocal Microscopy for Biologists*, lk 187–200. doi: 10.1007/978-0-306-48565-7_8.

Hooijschuur, J. H. (2017) „Fluorescence spectrometry - Fluorescence spectrometry - Chromedia“, *Chromedia*, lk 1. Available at: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=mkqjtbEsHiemBpdmBIIEcCArB&subNav=cczbdbEsHiemBpdmBIIEcCArBP%0Ahttp://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=mkqjtbEsHonOvmOIIEcCArB&subNav=cczbdbEsHonOvmOIIEcCArBP>.

Imlay, J. ja Liu, Y. (2013) „F1000Prime recommendations of: Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species.“, *Science (New York)*, 5691(March), lk 1210–1214. Available at: <http://f1000.com/717988031>.

Kadurina, M., Bocheva, G. ja Tonev, S. (2003) „Penicillin and semisynthetic penicillins in dermatology“, *Clinics in Dermatology*, 21(1), lk 12–23. doi: 10.1016/s0738-081x(02)00329-2.

- Kim, S. Y. *et al.* (2019) „Antibacterial strategies inspired by the oxidative stress and response networks“, *Journal of Microbiology*, 57(3), lk 203–212. doi: 10.1007/s12275-019-8711-9.
- Kohanski, M. A. *et al.* (2007) „A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics“, *Cell*, 130(5), lk 797–810. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.049.
- Lewis, K. (2013) „Platforms for antibiotic discovery“, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved., 12, lk 371. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd3975>.
- Lingzhi, L. *et al.* (2018) „The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance“, *Microbiological Research*. Urban & Fischer, 215, lk 126–129. doi: 10.1016/J.MICRES.2018.07.005.
- Marinho, H. S., Cyrne, L. ja Antunes, F. (2013) „H₂O₂ Delivery to Cells: Steady-State Versus Bolus Addition“, *Methods in Enzymology*. Academic Press, 526, lk 159–173. doi: 10.1016/B978-0-12-405883-5.00010-7.
- Morgan, B., Sobotta, M. C. ja Dick, T. P. (2011) „Measuring EGSH and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes“, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 51(11), lk 1943–1951. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.035.
- Müller, A. *et al.* (2017) „Systematic in vitro assessment of responses of roGFP2-based probes to physiologically relevant oxidant species“, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier B.V., 106(February), lk 329–338. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.044.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. ja Smith, D. F. (1974) „Culture medium for enterobacteria“, *Journal of Bacteriology*, 119(3), lk 736–747.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. ja Periyasamy, L. (2015) „Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases“, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), lk 11–26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.

- Ren, W. ja Ai, H. W. (2013) „Genetically encoded fluorescent redox probes“, *Sensors (Switzerland)*, 13(11), lk 15422–15433. doi: 10.3390/s131115422.
- Roth, N. *et al.* (2019) „The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview“, *Poultry science*, 98(4), lk 1791–1804. doi: 10.3382/ps/pey539.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. ja D’Ari, R. (2007) „*Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth“, *Journal of Bacteriology*, 189(23), lk 8746–8749. doi: 10.1128/JB.01368-07.
- Shaner, N. C., Patterson, G. H. ja Davidson, M. W. (2011) „Advances in fluorescent protein technology“, *Journal of Cell Science*, 124(13), lk 2321–2321. doi: 10.1242/jcs.094722.
- Soupene, E. *et al.* (2003) „Physiological Studies of *Escherichia coli* Strain MG1655“, *Journal of Bacteriology*, 185(18), lk 5611–5626. doi: 10.1128/JB.185.18.5611.
- Vevea, J. D. *et al.* (2013) „Ratiometric Biosensors that Measure Mitochondrial Redox State and ATP in Living Yeast Cells“, *Journal of Visualized Experiments*, (77). doi: 10.3791/50633.
- Wang, X. *et al.* (2018) „A Trimethoprim Conjugate of Thiomaltose Has Enhanced Antibacterial Efficacy in Vivo“, *Bioconjugate Chemistry*, 29(5), lk 1729–1735. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00177.
- Zeng, X. ja Lin, J. (2013) „Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria“, *Frontiers in Microbiology*, 4(MAY), lk 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2013.00128.
- Zhang, J. *et al.* (2002) „Creating new fluorescent probes for cell biology“, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), lk 906–918. doi: 10.1038/nrm976.

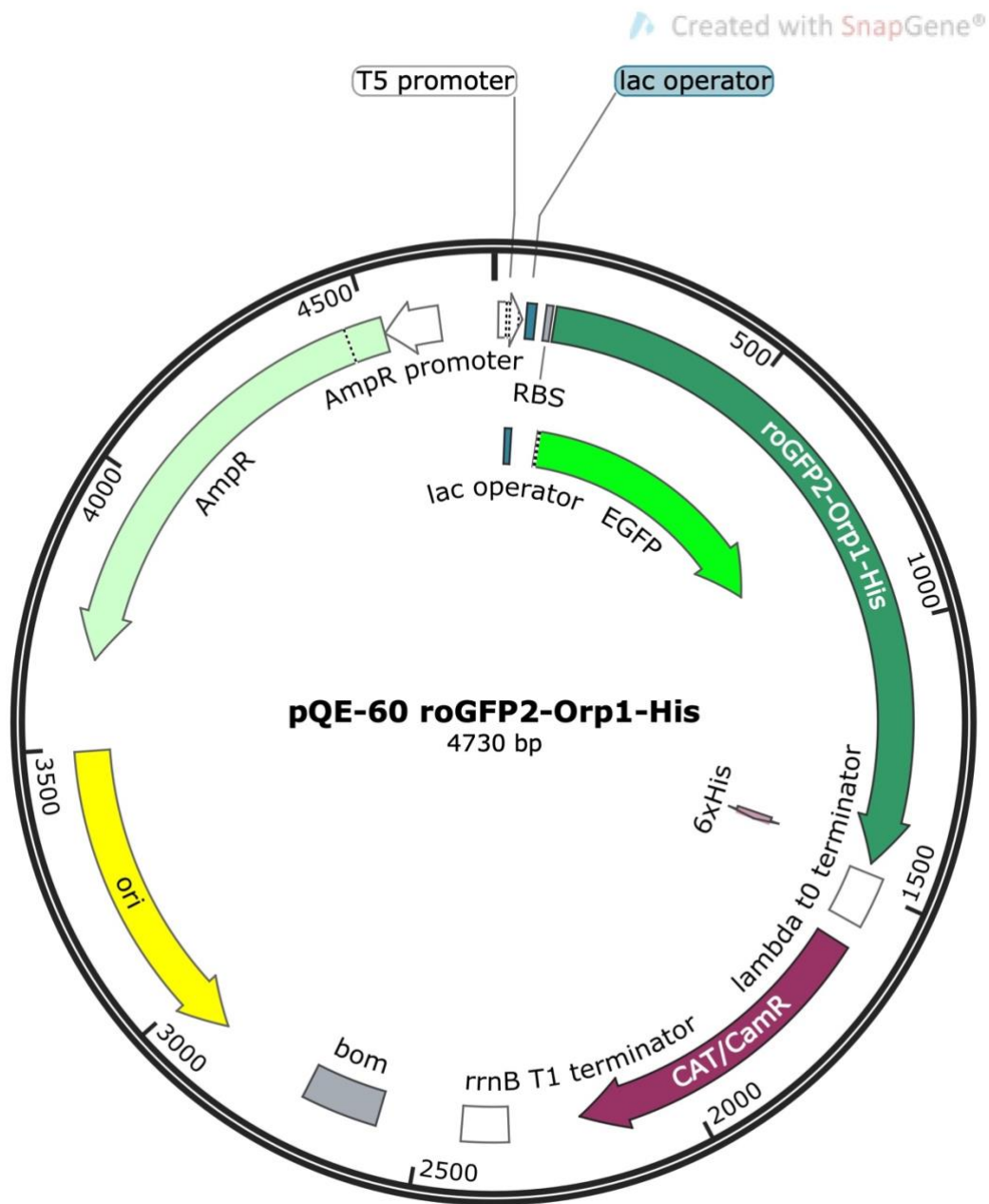
KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Thermo Fisher kodulehekülg. (i.a). Külastamise kuupäev: 17.05.2019,
<https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

E.coli vikipeedia kodulehekülg. (2012). Külastamise kuupäev 10.05.2019,
http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/DH5_alpha

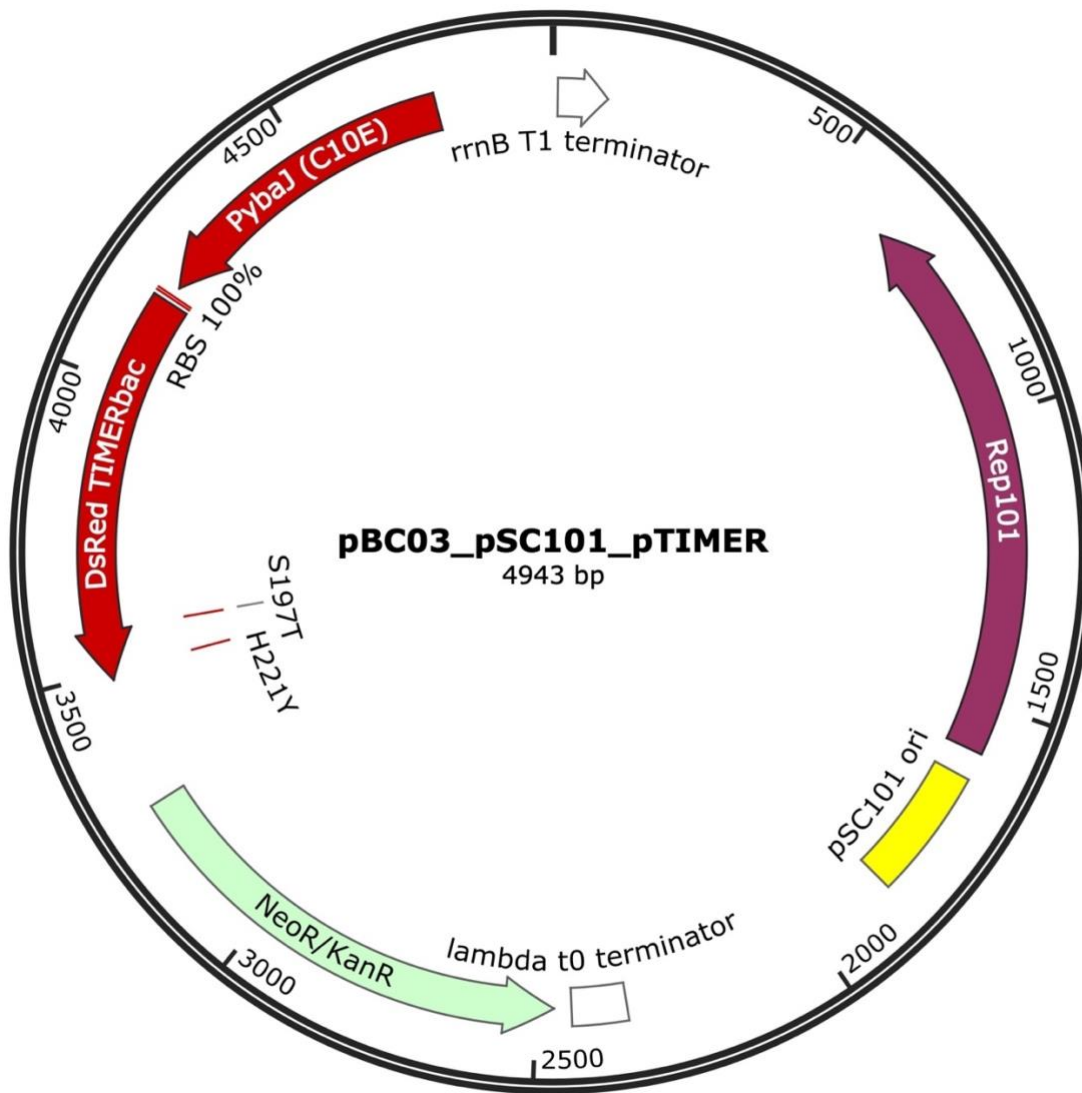
LISA 1

Doonorplasmiid pQE-60 roGFP2-Orp1-His



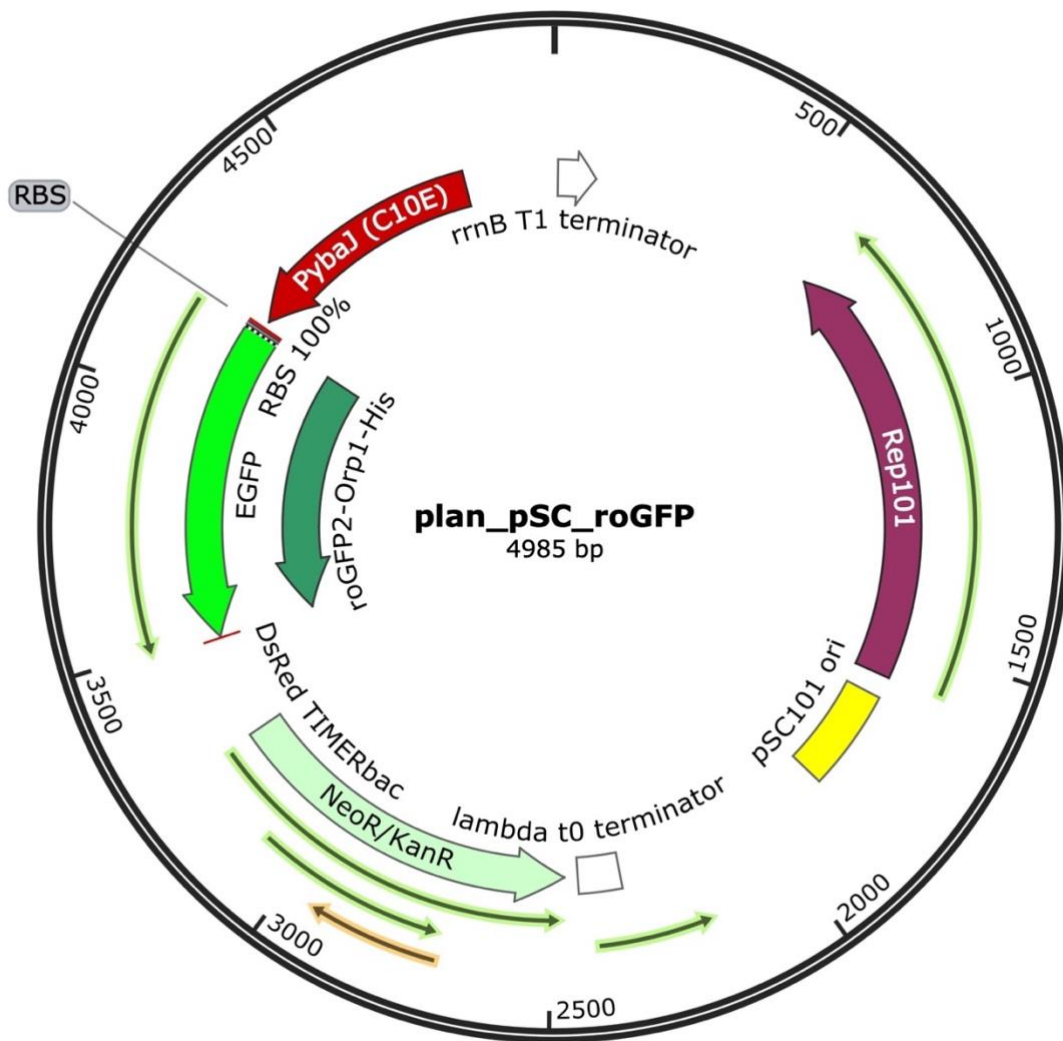
Doonorplasmiid pBC03_pSC101_pTIMER

Created with SnapGene®



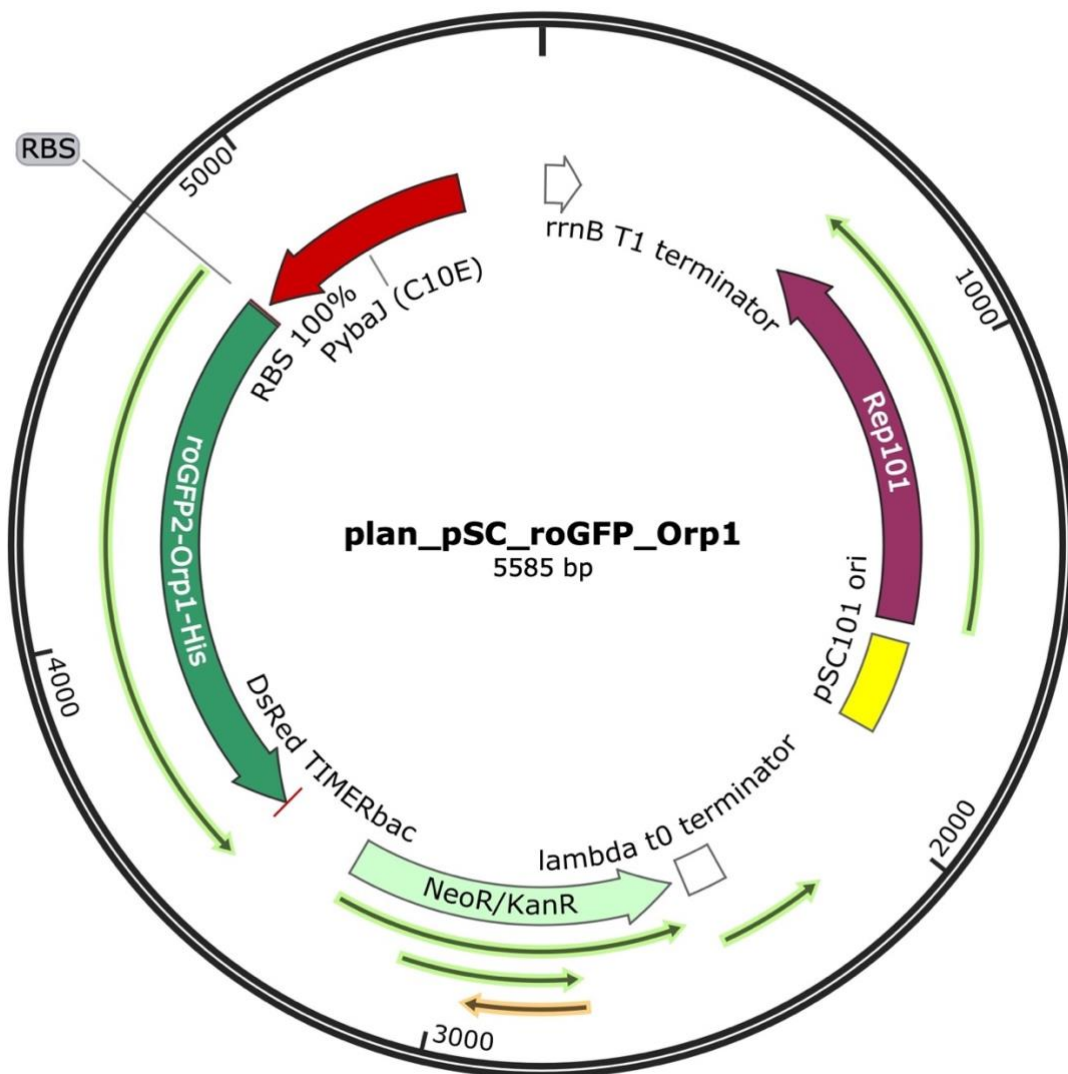
Konstrueeritud plasmiid plan_pSC_roGFP

Created with SnapGene®



Konstrueeritud plasmiid plan_pSC_roGFP_Orp1

Created with SnapGene®



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johanna Liis Udumets,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Oksüdatiivse stressi detekteerimine fluorestseeruva bioreporteriga bakteris *Escherichia coli* ampitsilliini juuresolekul

mille juhendaja on Marta Putrinš

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Johanna Liis Udumets

27.05.2019